# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　６　月　　２　日現在

機関番号：１３７０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2013
課題番号：２２５８０１０２

研究課題名（和文）新規（プロ）レニン受容体結合タンパク質の同定

研究課題名（英文）Identification of a novel binding protein for the (pro)renin receptor

研究代表者
中川　寅（Nakagawa, Tsutomu）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：１０２８１０４９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円、（間接経費）　　1,020,000円

研究成果の概要（和文）：（プロ）レニン受容体（PRR）は昇圧酵素レニンとその不活性前駆体プロレニンを結合する一回膜貫通型受容体である。PRRは細胞内シグナリングに加えてプロレニンの活性化を引き起こす。グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）を融合したPRR細胞外領域（GST-ECD）を培養細胞で発現させると小胞体様膜構造に分布し、界面活性剤を用いた二相分配で界面活性剤相に分画された。このことから、GST-ECDは直接又は間接的な膜との安定した結合を介して細胞内に残留している可能性が示唆された。PRRを安定発現する培養細胞からの免疫沈降と質量分析により、新規PRR結合タンパク質としてGRP78/BiPが同定された。

研究成果の概要（英文）：The (pro)renin receptor (PRR) is a single transmembrane receptor for the pressor enzyme renin and its inactive precursor prorenin. PRR induces the catalytic activation of prorenin along with intracellular signaling. In this study, the glutathione S transferase-fused extracellular domain of PRR expressed in mammalian cells was observed by immunofluorescence microscopy to be localized in the endoplasmic reticulum-like membranous structure, and recovered in the detergent phase in detergent-based two-phase separation experiments, suggesting retention inside the cell through stable membrane association. By co-immunoprecipitation of FALG-tagged PRR with its interacting proteins in human cultured cells and mass spectrometry, GRP78/BiP was identified as a novel binding protein for PRR.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：（プロ）レニン受容体　レニン-アンジオテンシン系　細胞内局在　小胞体　トランスロケーション　結合タンパク質

１．研究開始当初の背景

(1) 国内・国外の研究動向

（プロ）レニン受容体（PRR）は 2002 年、フランスの Nguyen らによって、ヒト腎臓 cDNA ライブラリーからの遺伝子クローニングによって同定された。PRR は血圧や電解質バランスの調節において重要な役割を担うレニン-アンジオテンシン系の律速酵素レニンに対する１回膜貫通型受容体である。PRR はレニンだけでなく、レニンの不活性前駆体であるプロレニンも結合し、酵素活性を発揮させる。PRR は、機能１）細胞表面での昇圧ペプチド アンジオテンシンⅡの産生と、機能２）細胞内シグナルの発信という２つの機能を併せもつユニークな分子である。血中に活性型レニンよりも高濃度に存在する不活性なプロレニンの生理学的意義、レニン-アンジオテンシン系との関連性が指摘される腎疾患や心血管疾患の発症・進展機構の解明への期待から、PRR の発見は大きな注目を集めた。

レニン-アンジオテンシン系の生化学を研究基盤にしていた研究代表者は、我が国でいち早く PRR 研究をスタートさせた。cDNA クローニングによって、ラット（DDBJ No. AB188298）、マウス（No. AB188299）、ニワトリ（No. AB192471）の PRR を同定・公表し、学内共同研究によって、PRR とレニンならびにプロレニンの結合の生化学的性質を明らかにしてきた。また、国内共同研究によって、糖尿病や高血圧の病態モデル動物を使って、PRR が糖尿病性腎症、高血圧性腎症、高血圧性心筋線維症に関与していることを示すなど、その生理機能の一端を明らかにしてきた。

(2) 本研究計画の着想に至った経緯

PRR の細胞内分布ならびに局在化機構については不明な点が多い。研究代表者は、PRR の細胞内分布を解析する目的で、緑色蛍光タンパク質 EGFP で標識したヒト PRR をサル腎臓由来 COS-7 細胞で発現させた。蛍光顕微鏡による観察の結果、Nguyen らの報告（2002 年）とは異なり、PRR は主に細胞内部に分布していることを見出した。また、その分布は小胞体マーカータンパク質の局在パターンと一致していた。この局在パターンは、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞、ハムスター卵巣由来 CHO 細胞ほか、解析した株化細胞、初代培養細胞の全てで共通していた。

研究代表者は、また、*in vitro* のリガンド結合アッセイに使用する目的で、遺伝子工学的に膜貫通領域と細胞質領域を欠失させた PRR 変異体（細胞外領域コンストラクト）を作成し、培養細胞での生産を試みた。この変異体は、膜に埋め込まれることなく、分泌タンパク質と同様に、構成的分泌経路に乗って培地中へ分泌されると期待された。しかしながら予想に反して、この変異体は細胞外へは分泌されず、細胞内の小胞体に局在していた。

これらの知見から、PRR の細胞外領域に結合し、PRR を小胞体に局在化させるような膜タンパク質が存在する可能性が考えられた。

２．研究の目的

一回膜貫通型受容体である PRR の細胞内分布ならびに局在化機構については不明な点が多い。本研究では、研究代表者のこれまでの実験結果から示唆された推定上の PRR 結合タンパク質を同定し、PRR との結合特性、ならびに PRR 機能の調節機構を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

(1) 実験材料

①培養細胞

サル腎臓由来 COS-7 細胞（RCB0539）ならびにヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞（RCB2202）は理研 BRC から、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞（JCRB1054）はヒューマンサイエンス研究資源バンクから提供された。

②抗体

１次抗体：抗 PRR 抗体（GTX114169）は GeneTex 社から、抗 GST 抗体ならびに抗カルネキシン抗体は SantaCruz 社から、抗 6His 抗体 9F2 は和光純薬工業から、抗アクチン抗体ならびに抗 FLAG M2 抗体は Sigma 社から、抗 KDEL 抗体と抗 GM130 抗体は MBL 社から各々購入した。２次抗体：Cy2 標識抗ウサギ IgG ならびに Rhodamine Red X 標識抗マウス IgG は Jackson ImmunoResearch Laboratories 社から購入した。抗 PRR 抗体（GTX114169）のエピトープは、予備検討の結果、ヒト PRR のアミノ酸残基 146-281 にマッピングされた。

③プラスミド

本研究で使用した組換えタンパク質の構造を図１に示す。グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）をキャリアータンパク質とする一連の GST 融合タンパク質、ならびに C 末端に 10His タグを付加した全長型ヒト PRR（PRR-10His）は、プラスミド pcDNA3（Invitrogen 社）を骨格として構築した。N 末端に FLAG タグを付加した全長型ヒト PRR（FLAG-PRR）は、エピソーマル型発現ベクター pEBMulti-Hyg（和光純薬工業）を骨格として構築した。

(2) 実験方法

①培養細胞での目的遺伝子の一過性発現

目的遺伝子が組み込まれたプラスミドを、ポリエチレンイミン（PEI）法を用いて COS-7 細胞、HepG2 細胞、HEK293T 細胞に導入して発現させ、48 時間後に解析した。

②安定発現株の樹立

GST 融合タンパク質を安定発現する HepG2 細胞株は、該当するプラスミドを、FuGENE 6（Roche diagnostics 社）を用いて細胞に導入し、G-418 を含む選択培地で増殖したコロニーを選抜、使用した。

FLAG-PRRを安定発現するHEK293T細胞株は、FLAG-PRR 遺伝子を組み込んだ pEBMulti-Hygを、PEI 法を用いて HEK293T 細胞に導入し、ハイグロマイシンを含む選択培地で増殖した細胞集団を用いた。ネガティブコントロールとして、FLAG-PRR 遺伝子をもたないpEBMulti-Hygを導入した細胞集団を用いた。

ヒトPRR-10Hisを安定発現するハムスター卵巣由来 CHO 細胞株（CHO/PRR-10His）は、まず、PRR-10His 遺伝子が組み込まれたpcDNA3 とマウスジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子が組み込まれたプラスミドpmDHFRを細胞に共導入し、G-418 を含む選択培地で増殖したコロニーを単離した。次いで、メトトレキセートを含む培地で培養し、PRR-10His を高発現するクローンを選抜し、以後の実験で使用した。

③細胞および培地中のタンパク質の調製

目的タンパク質を一過性発現もしくは安定発現する細胞を 48 時間培養した。培地は回収後に遠心し、細胞などを除去して用いた。細胞は緩衝液で洗浄後、実験に応じて、細胞溶解緩衝液もしくは SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)用サンプル緩衝液に直接、溶解した。

④膜結合性および水溶性タンパク質の分画

ミセル水性二相分配法を利用したCelLytic MEM Protein Extraction Kit（Sigma-Aldrich 社）を用い、取扱説明書に従って疎水性、水溶性タンパク質を分画した。GSTを付加した全長型ヒトPRR(GST-FL)、PRR細胞外領域（GST-ECD)、小胞体残留シグナル（GST-KDEL）を各々安定発現するHepG2細胞を溶解・分離緩衝液で溶解し、遠心分離により細胞片と核を除いた上清を細胞溶解液（T）として回収した。細胞溶解液Tを、界面活性剤相（疎水性タンパク質が含まれる）と水相（A）（親水性タンパク質が含まれる）に分画した。界面活性剤相を洗浄緩衝液で洗浄し、洗浄液（W）と最終的な界面活性剤相（D）に分画した。T、A、W、Dを SDS-PAGE 後、抗GST抗体、抗カルネキシン抗体、抗アクチン抗体を用いてウェスタンブロットを行い、標的タンパク質の分画状況を解析した。

⑤間接蛍光抗体法による細胞内局在の解析

カバーガラス上に生やした COS-7 細胞に、GST 融合タンパク質をコードするプラスミドを導入・発現させた。細胞を 3.7% ホルムアルデヒドを含む緩衝液で固定後、界面活性剤で膜透過処理を行った。2% ウシ血清を含む緩衝液でブロッキングした後、標的タンパク質に対する抗体を反応させた。緩衝液で洗浄後、Cy2 もしくは Rhodamine Red X 標識された２次抗体を反応させた。核は H33342 で染色した。蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した。

⑥GST プルダウンアッセイ

GST融合タンパク質とFLAGタグを付加した全長型PRR（FLAG-PRR）とを HEK293T 細胞に共発現させた。細胞を緩衝液で洗浄後、界面活性剤を含む緩衝液に溶解した。遠心により不溶物を除去した後（T)、GST を結合するアフィニティー担体（グルタチオンセファロースビーズ、GE ヘルスケア社）を用いて、GST融合タンパク質とそれに結合するタンパク質（B）を回収した。タンパク質複合体をSDS-PAGE で分離後、抗 GST 抗体、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

⑦Hisタグタンパク質プルダウンアッセイ

CHO/PRR-10His 細胞を、界面活性剤を含む緩衝液に溶解した。遠心により不溶物を除去した後、His タグを結合するアフィニティー担体（Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown、Invitrogen 社)を用いて PRR-10Hisとそれに結合するタンパク質を回収した。タンパク質複合体を SDS-PAGE で分離後、抗 PRR抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

## ４．研究成果

### (1) PRR 細胞外領域コンストラクトの細胞内残留機構

研究代表者はこれまでに、N 末端に FLAG タグ、C 末端に 10His タグを付加したラット PRR細胞外領域コンストラクトを COS-7 細胞で発現させると、細胞内に残留することを見出している。本研究では、GST の N 末端にシグナルペプチドを付加することにより作出した分泌型 GST をキャリアータンパク質とするGST 融合タンパク質（図 1）を用いて、この現象を確認するとともに、残留機構について調べ、以下の成果を得た。

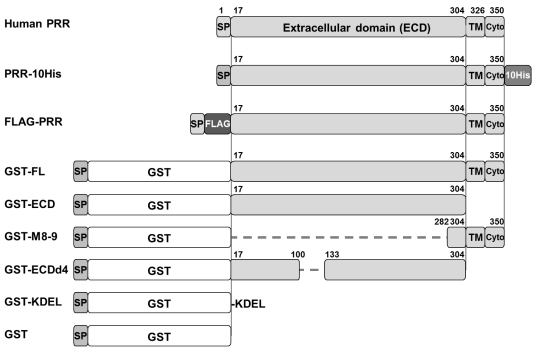


図1　本研究で使用したPRRの構造

①分泌型 GST のみのコンストラクトは培地に効率よく分泌されたのに対して、小胞体残留配列 KDEL を付加した GST-KDEL はほとんど分泌されずに細胞内に蓄積した（図 2A)。このことから、分泌型 GST は、付加したタンパク質の細胞内貯留性を評価し得ることが確認された。膜貫通型の全長型 PRR を付加したGST-FL は、予想通り細胞に残留し、分泌され

なかった。細胞外領域コンストラクト GST-ECD は、膜貫通領域と細胞質領域をもたないにもかかわらず、細胞に存在しており、分泌されなかった。

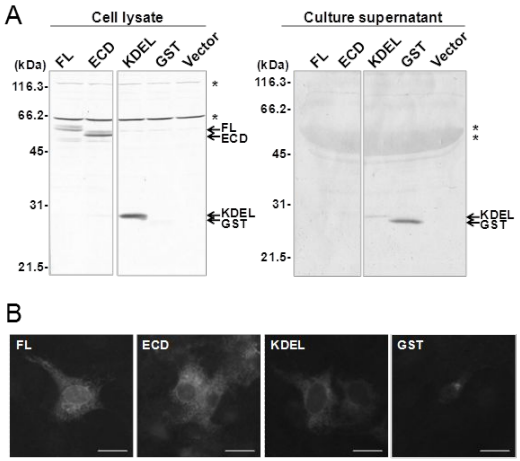


図2 COS-7細胞におけるGST融合タンパク質の分布

②①の COS-7 細胞において、抗 GST 抗体を用いた間接蛍光抗体法により細胞内分布を解析した結果、GST-FL と GST-ECD のどちらも、小胞体残留配列を付加した GST-KDEL と同様の細胞内の膜様構造に局在することが明らかになった（図 2B）。

③上記の GST 融合タンパク質を HepG2 細胞に一過性発現ならびに安定発現させ、①と同様に解析した。GST-FL と GST-ECD は細胞内に残留した（図 3A、B）。このことから、これらコンストラクトの細胞内残留は COS-7 細胞に限った現象ではなく、また、一過的な過剰発現による悪影響でもないことが確認された。

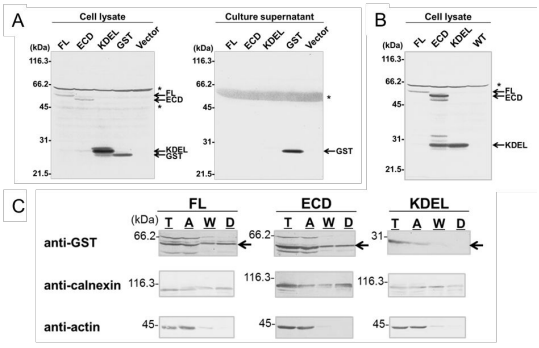


図3 HepG2細胞におけるGST融合タンパク質の分布

以上の結果から、PRR 細胞外領域コンストラクトは細胞内に残留する性質を有しており、特定のタグ、特定の細胞だけに当てはまる特殊な現象でないことが明らかになった。

④そこで、膜貫通領域をもたない細胞外領域コンストラクトがどのような機構で細胞内に残留しているかについて知見を得るために、GST 融合タンパク質を安定発現する HepG2 細胞を材料にして、界面活性剤を用いた二相分配法によって、細胞タンパク質を親水性タンパク質と疎水性タンパク質に分画した。

可溶性タンパク質であるアクチンは水相に回収され、界面活性剤相には検出されなかった（図 3C）。一方、疎水性タンパク質（一回膜貫通タンパク質）のカルネキシンは界面活性剤相に検出されたことから、想定通りに分画できていることが確認された。下流のオルガネラ（ゴルジ体）に存在する受容体（KDEL 受容体）による回収機構で小胞体に残留するタンパク質のモデルとなる GST-KDEL は、界面活性剤相に検出されなかった。膜貫通領域をもつ GST-FL は、界面活性剤相に回収された。GST-ECD は、膜貫通領域をもたないにもかかわらず、界面活性剤相に回収された。

これらの結果から、PRR 細胞外領域コンストラクトは、直接的、もしくは間接的な膜との安定した結合を介して細胞内に残留していることが示唆された。

これらの成果は、論文①として公表した。

(2) 結合タンパク質の同定と機能解析

アフィニティータグ（FLAG タグ）を N 末端に付加したヒト PRR（FLAG-PRR）を安定発現する HEK293T 細胞株を樹立し、PRR を小胞体に局在化させる結合タンパク質を同定した。

①エピソーマル型発現ベクター pEBMulti-Hyg を用いて、FLAG-PRR を安定発現する HEK293T 細胞株を樹立した。ネガティブコントロールとして、FLAG-PRR を組み込んでいないベクターを導入した細胞株を樹立した。抗 FLAG 抗体ならびに抗 PRR 抗体を用いたウェスタンブロット解析ならびに間接蛍光抗体法を用いた細胞内局在の観察から、目的とする細胞株であることを確認した。

②両細胞株の細胞溶解液から、抗 FLAG 抗体が固定化されたアフィニティー担体を用いて、FLAG-PRR ならびにこれと複合体を形成しているタンパク質を回収した。タンパク質複合体を SDS-PAGE で分離後、銀染色によって可視化した。その結果、FLAG-PRR を発現する細胞に特徴的に検出される分子量 7 万のタンパク質バンドが検出された。

③質量分析装置を用いたプチドマスフィンガープリント（PMF）解析の結果、このタンパク質は GRP78/BiP（以降、GRP78）と同定された。

④GRP78 が $Ca^{2+}$結合タンパク質であることから、PRR と GRP78 の結合に及ぼす $Ca^{2+}$の影響を解析した。その結合、PRR と GRP78 の結合は $Ca^{2+}$濃度依存的であり、PRR と GRP78 との結合を指標にした見かけの $K_d$ 値は 0.8 mM であった。この値は、GRP78 と $Ca^{2+}$との結合の $K_d$ 値 0.7 mM（Lamb ら、2006 年）と同等なことから、PRR と GRP78 との結合が、GRP78 へ

の $Ca^{2+}$の結合によって調節されている可能性を示唆している。

GRP78 は変性タンパク質に結合して正しい折りたたみを促進する分子シャペロンとしての働きをもつ。そのほか GRP78 は、ATF6、IRE1、PERK などの小胞体ストレスセンサータンパク質に結合してその機能を抑制的に調節しており、小胞体ストレス時に、これらのタンパク質から解離することによってセンサーを起動させる働きをもっている。小胞体ストレスが PRR と GRP78 の結合に及ぼす影響について、引き続き解析を進める。小胞体ストレスは、糖尿病、肥満、癌、神経変性などの疾患との関連性が報告されており、本研究の成果は、PRR 研究を新しい領域へと展開させるものである。

(3) PRR の二量体化機構

(1)の結果は、PRR 細胞外領域コンストラクトが直接、もしくは間接的に（膜結合タンパク質を介して）膜と安定して結合していることを示唆するのに対して、(2)で同定された PRR 結合タンパク質は可溶性タンパク質であり、矛盾している。PRR は二量体化することが知られているが、二量体化にかかわる領域は明らかになっていない。そこで、PRR（細胞外領域コンストラクト）の結合タンパク質が PRR 自身である可能性を検討した。

①PRR の全長（FL）、細胞外領域（ECD）、膜貫通領域を含む C 末端断片（M8-9）を前出の分泌型 GST に付加した融合タンパク質（図 1）と FLAG-PRR を HEK293T 細胞に共発現させ、GST プルダウンアッセイにより、両者の結合を解析した。その結果、FLAG-PRR は、全長ならびに細胞外領域に結合したが、C 末端断片には極々わずかにしか結合しなかった（図 4、レーン B）。ネガティブコントロールに用いた GST のみ、ならびに GST-KDEL には結合しなかった。

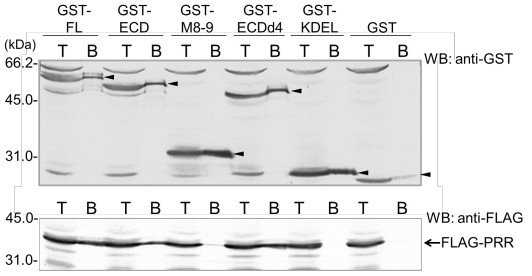


図4 全長型PRRとPRR各領域の相互作用の解析

②C 末端に 10His タグを付加したヒト PRR を安定に高発現する CHO 細胞株（CHO/PRR-10His）を樹立した。ウェスタンブロット解析から、この細胞では、内在性のプロテアーゼによって膜貫通領域と細胞質領域を含む C 末端を失った可溶型 PRR が作られることが明らかになった。また、間接蛍光抗体法による細胞内分布の解析から、全長型 PRR と可溶型 PRR の双方が、小胞体に局在していることが明らかになった。

③CHO/PRR-10His 細胞溶解液から、His タグに対するアフィニティー担体を用いたプルダウンアッセイを行った結果、10His タグをもつ全長型 PRR と共に、His タグをもたない可溶型 PRR が回収された。このことから、可溶型 PRR は全長型 PRR と複合体を形成していることが明らかになった。

以上の結果から、PRR の二量体化において細胞外領域が重要な役割を担っており、可溶型 PRR の少なくとも一部は、小胞体に局在する全長型 PRR に結合することにより細胞内に残留している可能性が示唆された。

これらの成果は、論文②として公表した。

可溶型 PRR は血中や尿中に検出され、臓器障害のバイオマーカーとして注目されている。本研究の成果は、可溶型 PRR の分泌が調節されている可能性を示唆するもので、今後のさらなる検討が期待される。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計２件）


① Suzuki-Nakagawa, C., Nishimura, M., Noda, M., Iwata, H., Hattori, M. Ebihara, A., Suzuki, F. and Nakagawa, T.: Intracellular retention of the extracellular domain of the (pro)renin receptor in mammalian cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2014. (in press)（査読有）

② Suzuki-Nakagawa, C., Nishimura, M., Tsukamoto, T., Aoyama, S., Ebihara, A., Suzuki, F. and Nakagawa, T.: Participation of the extracellular domain in (pro)renin receptor dimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **444**, 461-466, 2014.（査読有）


〔学会発表〕（計５件）


① 戸松千裕、荒川和希、廣瀬ひとみ、中川千春、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅：新規（プロ）レニン受容体結合タンパク質の同定と解析、日本農芸化学会中部支部第 168 回例会、2013 年 10 月 12 日、名古屋大学シンポジオン.

② Suzuki-Nakagawa, C., Nishimura, M., Tsukamoto, T., Aoyama, S., Ebihara, A., Suzuki, F. and Nakagawa, T.: Extracellular domain of the (pro)renin receptor participates in dimerization. American Heart Association High

Blood Pressure Research 2013 Scientific Sessions（アメリカ心臓協会高血圧研究会議）、2013 年 9 月 12 日、ニューオーリンズ・マリオット（アメリカ合衆国ニューオーリンズ）.

③ 中川寅、中川千春、西村美沙、海老原章郎、鈴木文昭：（プロ）レニン受容体の多量体化における細胞外ドメインの重要性．血圧とホルモン科学協会 第 5 回（プロ）レニン受容体フォーラム、2013 年 5 月 18 日、新宿ワシントンホテル.

④ 西村美沙、中川千春、塚本知子、青山奨、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅：細胞内（プロ）レニン受容体の分子性状と細胞内分布、第 76 回日本生化学会中部支部例会、2012 年 5 月 26 日、自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター.

⑤ 中川千春、西村美沙、野田雅子、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅：（プロ）レニン受容体細胞外領域の細胞内局在への関与、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館.

〔その他〕
ホームページ等
http://www.abios.gifu-u.ac.jp/nakagawa/

## 6．研究組織
(1)研究代表者
中川　寅（NAKAGAWA　TSUTOMU）
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：10281049